

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 3522075 A1**

⑳ Aktenzeichen: P 35 22 075.9
㉑ Anmeldetag: 20. 6. 85
㉒ Offenlegungstag: 2. 1. 87

㉓ Int. Cl. 4:
C07 D 493/08

C 07 D 303/16
C 07 C 69/618
A 61 K 31/335

DE 3522075 A1

㉔ Anmelder:

LOMAPHARM, Rudolf Lohman GmbH KG
Pharmazeutische Fabrik, 3254 Emmerthal, DE

㉕ Vertreter:

Schwabe, H., Dipl.-Ing.; Sandmair, K., Dipl.-Chem.
Dr.jur. Dr.rer.nat.; Marx, L., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat.,
Pat.-Anw., 8000 München

㉖ Erfinder:

Wagner, Hildebert, Prof. Dr., 8211 Breitbrunn, DE;
Bauer, Rudolf, Dr., 8000 München, DE; Ott, Holger,
3254 Emmerthal, DE

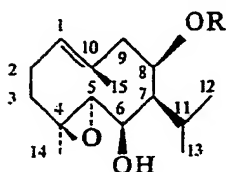
㉗ Sesquiterpenverbindungen, Verfahren zu ihrer Isolierung und Arzneimittel, enthaltend diese Verbindungen

BEST AVAILABLE COPY

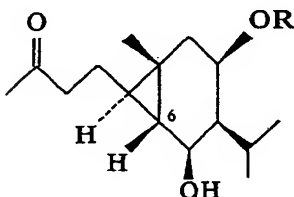
DE 3522075 A1

Patentansprüche

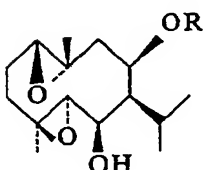
1. Sesquiterpenverbindungen und ihre Enantiomere der Formeln



Ester 1



Ester 2a



Ester 2b

in welchen R den Rest einer aromatischen Säure, im besonderen Cinnamoyl bedeutet, erhalten durch Extraktion aus *Echinacea purpureae* radix oder anderen Pflanzen der Compositen-Familie.

2. Verfahren zur Gewinnung von Sesquiterpenverbindungen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) die pulverisierte Droge (*Echinacea purpurea*-Wurzel) oder anderen Pflanzen aus der Compositen-Familie mit Chloroform oder Lösungsmitteln ähnlicher Extraktionskraft extrahiert,

(b) den erhaltenen Extrakt mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Kieselgel und Toluol-Ethylacetat (8:2) oder Fließmittel mit ähnlichem elutropen Verhalten als Elutionsmittel chromatographiert und die einzelnen Fraktionen mittels DC auf ihren Gehalt an Sesquiterpenverbindungen überprüft,

(c) die nacheinander gewonnenen Fraktionen mit Gehalten an Ester 1 bzw. Ester 2a/b zu Sammelfrak-tionen der einzelnen Esterverbindungen vereinigt und

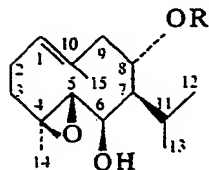
(d) die erhaltenen Sammelfraktionen, jede für sich, mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit Toluol-Ethylacetat als Fließmittel oder mittels präparativer Hochleistungs-Flüssigchromatographie auf einer Umkehrphase reinigt.

3. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine oder mehrere Sesquiterpenverbindungen nach An-spruch 1 und übliche Hilfs- und Trägerstoffe.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die in Pflanzen der Compositen-Familie, im besonderen in *Echinacea purpurea* und *E. angustifolia* vorkommenden Sesquiterpenverbindungen sowie pharmazeutische Zubereitungen, welche diese Verbindungen in angereicherter oder standardisierter Form enthalten. Diese Verbindungen weisen immunmo-dulierende Wirkungen auf.

Von WADA et al in Agr. Biol. Chem., Vol. 34, Nr. 6, S. 946—953 (1) wurden bereits aus *Parabenzoin trilobum* (Lauraceae) eine als Shiromodiol bezeichnete Verbindung



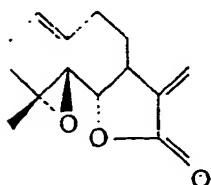
Shiromodiol

isoliert. Die absolute Konfiguration von Shiromodiol, das in der Pflanze als 8-Monoacetat und 6,8-Diacetat vorliegt, wurde durch Röntgenstrukturanalyse gesichert (Mc Clure et al., Chem. Communications 128 (1970)). Die relative Konfiguration von Shiromodiol an der Epoxidgruppe (C4, C5) wurde als zweimal β -ständig interpretiert. Durch Betrachtung der Röntgenstrukturdaten und Vergleich mit anderen Verbindungen, welche diese Epoxygruppe ebenso tragen, muß man sie als 4- β - und 5- α -ständig einordnen.

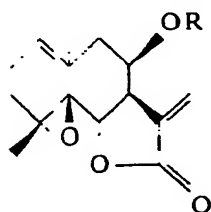
Eine mit Ugandiol bezeichnete Verbindung wurde von russischen Arbeitsgruppen aus verschiedenen Ferula-Arten isoliert und als identisch mit Shiromodiol bezeichnet, ohne daß genauere Angaben bezüglich der Stereochemie gemacht wurden.

Ugandiol kommt in der Pflanze ebenfalls verestert vor, und zwar mit Essigsäure, Angelicasäure, 3', 4', 5'-Tri-methoxybenzoesäure, 4'-Hydroxy-3'-methoxy-benzoesäure und 4'-Methoxybenzoesäure (Kadyrov et al. 5
Khim. Prir. Soedin. 11, 152 (1975); ref. C.A. 83, 111106 (1975)).

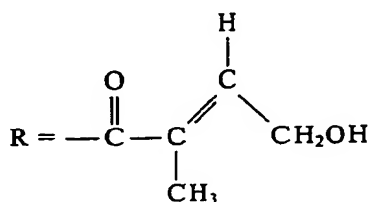
Es existieren eine Reihe von Germacranverbindungen mit ähnlichen Partialstrukturen wie Shiromodiol bzw. wie die des nachstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Esters 1. Die meisten dieser Verbindungen gehören dem Germacranolid-Typ an, d. h. sie besitzen eine Lactonstruktur im Molekül (oft mit exocyclischer Doppelbin- 10
dung). Als Beispiele seien die nachstehenden Verbindungen angeführt:



Germacranolide mit ähnlicher Partialstruktur wie Shiromodiol
Parthenolid aus *Ambrosia confertifolia*, Compositae, *Tanacetum par-*
thenium, *Michelia lanuginosa*, Magnoliaceae 15

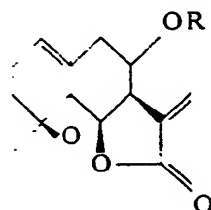


Eupahyssopin aus *Eupatorium hyssopifolium*, Compositae 20

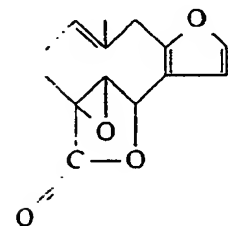


Verbindung 15 aus *Montanoa dumicola*, Compositae 30

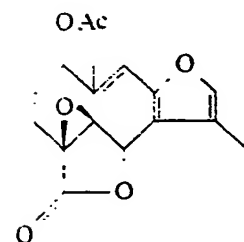
R = Aug



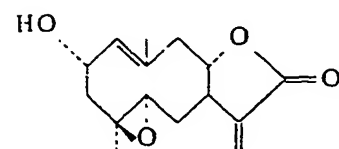
Linderan aus *Lindera strychnifolia*, Lauraceae 40



Zeylanan aus *Neolitsea aciculata*, Lauraceae 50

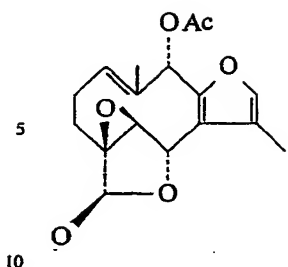


Baileyin aus *Baileya sp.*, Compositae 60

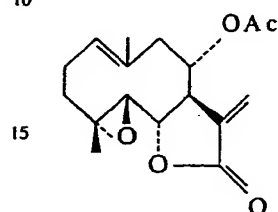


BEST AVAILABLE COPY

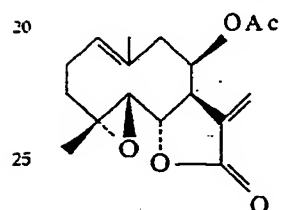
Litseaculan aus *Neolitsea aciculata*, Lauraceae



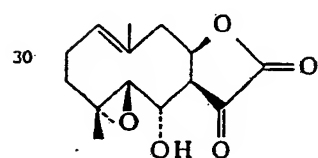
11,13-Dehydrolanuginolid aus *Michelia*
Lanuginosa Magnoliaceae



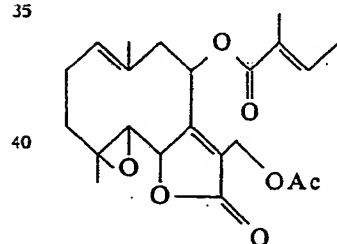
Lipiferolid aus *Liriodendron tulipifera*, Magnoliaceae



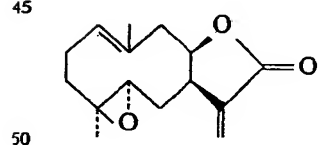
Simsiolid aus *Simsia dombeyana*, Compositae



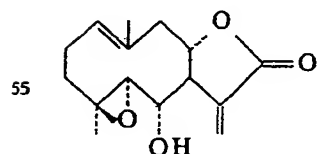
Marginatin aus *Vernonia marginata*, Compositae



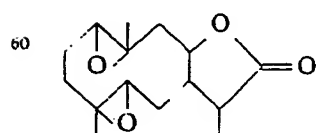
4 β ,5 α -Epoxy-4,5-H-cis-inunolid aus *Inula heleni* *Inula royleana*,
Compositae



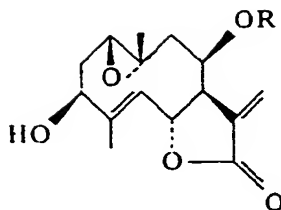
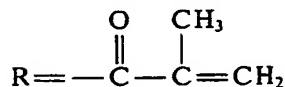
Speciformin aus *Artemisia tridentata* und *A. arbuscula*, Compositae



Eriolin aus *Eriophyllum confertifolium*, Compositae



BEST AVAILABLE COPY

Erioflorin aus *Eriophyllum confertifolium*, Compositae

Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen handelt es sich um Inhaltsstoffe von *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH und anderen Vertretern der Compositen-Familie, die gemäß dieser Erfindung erstmalig aus Wurzeln verschiedener Provenienz dieser Pflanze isoliert wurden. Die Sesquiterpenverbindungen dieses Typs liegen in der Pflanze vorwiegend in Form ihrer Zimtsäureester vor.

Die Extraktion der Sesquiterpenester erfolgt mit lipophilen Lösungsmitteln (z. B. Chloroform). Zur Anreicherung kann die Säulenchromatographie an Kieselgel mit Toluol-Ethylacetat als Elutionsmittel angewandt werden. Die endgültige Reinigung erfolgt durch präparative Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel und präparative HPLC unter Verwendung von Umkehrphasensystemen.

Die Isolierung der erfindungsgemäßen Sesquiterpenester sowie ihre Analytik und ihre Konstitution werden in den nachfolgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Extraktion, Reinigung und Analyse der Sesquiterpenester aus *Echinacea purpurea*

1. Drogenextraktion

Die Extraktion der Sesquiterpenester aus *Echinacea purpurea* radix wird mit Chloroform in einem Soxhlet-Extraktor durchgeführt. Bei Einsatz von 200 g pulverisierter Droge wird 9 h lang extrahiert. Man erhält nach dem Abdampfen des Chloroforms ca. 6 g eines zähflüssigen, braungefärbten Extrakts, der die erfindungsgemäßen Ester in angereicherter Form enthält.

2. Säulenchromatographie

Die Auftrennung der Ester erfolgt mittels Säulenchromatographie unter Verwendung von Kieselgel 60 (Korngröße 63–200 µm) und Toluol-Ethylacetat (8:2) als Elutionsmittel.

Auf die naß gepackte Säule (Durchmesser 4 cm; Füllhöhe 40 cm) wird der in wenig Elutionsmittel gelöste Extrakt mit einer Pipette kreisförmig aufgetragen und erst nach vollständigem Einziehen mit Elutionsmittel überschichtet.

Es wird in Schritten von ca. 7 ml fraktioniert. Die ersten 54 Fraktionen werden verworfen. Nach Überprüfung mittels DC werden die Fraktionen 55 bis 60 (I), 61 bis 66 (II), 67 bis 72 (III), 73 bis 75 (IV), 76 bis 82 (V), 83 bis 90 (VI) und 91 bis 98 (VII), vereinigt. Die Sammelfraktionen I bis IV enthalten den Ester 1 in angereicherter Form, während die Sammelfraktionen V bis VIII hauptsächlich die Ester 2 enthalten. Die Ausbeute der Sammelfraktionen I bis IV liegt bei 470 mg, die von V bis VII bei 300 mg, bezogen auf 6 g eingesetzten Chloroform-extrakt.

3. Präparative DC

Die endgültige Reinigung der Ester erfolgt mittels präparativer Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten mit dem Fließmittel Toluol-Ethylacetat (19:4) und mit präparativer HPLC (LiChrosorb RP 18, 7 µm, 250–4 mm; Acetonitril-Wasser 8:2).

4. Analytik

(a) Dünnschichtchromatographie DC

Die DC der Sesquiterpenverbindungen aus *Echinacea* erfolgt auf HPLC-Kieselgel 60 F 254-Fertigplatten mit dem Laufmittel Toluol-Ethylacetat (7:3). Die Zimtsäureester erscheinen im UV 254 nm als blaue Zonen auf grünem Grund. Der R_f -Wert des Esters 1 beträgt 0,57, der von Ester 2a/b 0,48.

Nach Besprühen mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz und Erhitzen auf 120°C (ca. 3 min) erscheint Ester 1 als blaue Zone, die Ester 2a und 2b als gelbe Zone.

Die Detektion kann auch mit dem EP-Reagenz nach STAHL (Dtsch. Apotheker Ztg. 93, 197 (1953) erfolgen, das Proazulene erfaßt. Ester 1 reagiert mit diesem Reagenz violett, die Ester 2 türkisfarben.

Die Ester reagieren auch mit Phosphormolybdänsäure (blau), Antimon(III)-chlorid-Reagenz (violett, rot im UV 366 nm), Komarowsky-Reagenz (blau bzw. gelb).

(b) Hochleistungsflüssigchromatographie HPLC

Die HPLC-Trennung der Sesquiterpenester erfolgt mit einem Umkehrphasensystem. Es wurde speziell eine C18-Umkehrphase mit 5 µm Teilchendurchmesser verwendet. Als Fließmittel dient ein Gradient aus Acetonitril/Wasser (20% acetonitril – 80% Acetonitril in 30 Min.) Die Trennung der Ester wird am besten bei 280 nm detektiert.

Die drei Hauptkomponenten (Ester 1, 2a, 2b) besitzen folgende relative Retention:

Ester 1: 17,3
 Ester 2a: 16,0
 Ester 2b: 13,0

5

5. Chemische Konstitution der erfindungsgemäßen Ester

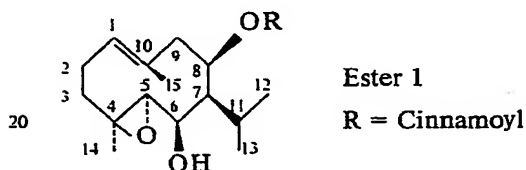
Bei den erfindungsgemäßen Verbindungen handelt es sich um Zimtsäureester von Sesquiterpenalkoholen. Die Sesquiterpene sind vom Germacran- und Xanthan-Typ und besitzen zwei Hydroxylgruppen, die sich in 6- und 8-Stellung befinden. Das C-Atom 7 trägt eine Isopropylgruppe. An den Atomen C4 und C5 bzw. C10 und C1 kann eine Epoxygruppe gebunden sein oder eine Doppelbindung vorliegen. Die Veresterung erfolgt an der OH-Gruppe in C8-Stellung.

Im einzelnen wurden aus *Echinacea purpurea* die nachfolgend beschriebenen Verbindungen isoliert.

(a) Ester 1

Ester 1 besitzt folgende relative Konfiguration:

15



20

Es handelt sich um eine ölige, harzige Substanz mit dem Molekulargewicht 384.

Sie wurde strukturell durch IR-Spektrum, UV-Spektrum, PMR-Spektrum ^{13}C -NMR-Spektrum und Röntgenstrukturanalyse des Alkohols charakterisiert und war als solche bisher in der Literatur nicht bekannt. Es handelt sich um die erste nichtflüchtige, aus *Echinacea purpurea* isolierte Sesquiterpenverbindung.

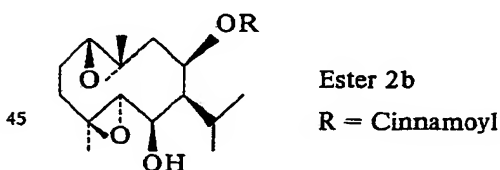
Der diesem Ester zugrundeliegende Alkohol ist in dieser relativen Konfiguration bisher nicht bekannt gewesen. Von Wada et al. (1) wurde Shiromodiol, eine an C-8 epimere Verbindung beschrieben. Obwohl die relative Konfiguration von Shiromodiol von WADA et al. (1) an der Epoxidgruppe (C4, C5) als zweimal β -ständig angegeben wurde, ergibt sich durch Betrachtung der Röntgenstrukturdaten und Vergleich mit anderen Verbindungen, welche diese Epoxidgruppe ebenfalls aufweisen, daß sie als 4- β - und 5- α -ständig einzuordnen ist, wie dies auch für den erfindungsgemäßen Ester 1 zutrifft. Der Vergleich der Röntgenstrukturdaten von Shiromodiol und Ester 1 ergab im Bereich der Epoxidgruppe bezüglich der relativen Konfiguration absolute Übereinstimmung. Ein Unterschied zu Shiromodiol betrifft auch die Stellung der Methylgruppen. Bei Shiromodiol sind beide auf derselben Ringseite, während sie bei Ester 1 α - und β -gerichtet sind.

35

(b) Ester 2b

Ester 2b, dessen zugrundeliegender Sesquiterpenalkohol durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert wurde, besitzt folgende Struktur (relative Konfiguration):

40



45

Es handelt sich um eine harzig-ölige Substanz. Sie besitzt das Molekulargewicht 400.

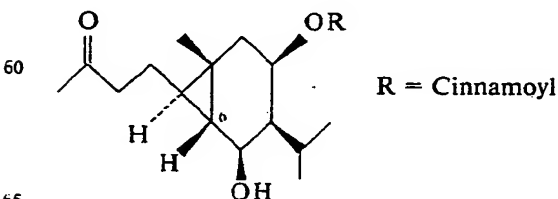
Sie ist strukturell durch IR-Spektroskopie, UV-Spektroskopie, PMR- und ^{13}C -NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Die Struktur ist bisher in der Literatur nicht bekannt, auch nicht die des entsprechenden Alkohols. Für verwandte Verbindungen gilt das gleiche, wie für Ester 1 bereits dargelegt wurde.

Ester 2a

Ester 2a, dessen zugrundeliegender Alkohol durch spektroskopische Methoden (NMR, MS, IR) aufgeklärt wurde, besitzt folgende relative Konfiguration:

55



60

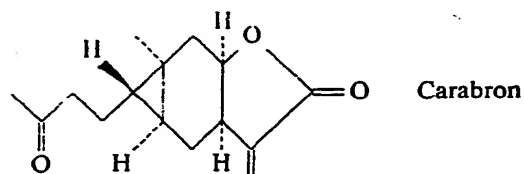
65

Die veresterte Verbindung ist bisher nicht beschrieben worden. Auch der zugrundeliegende Alkohol ist genuin in einer Pflanze bisher nicht gefunden worden.

BEST AVAILABLE COPY

Von Wada et al (Tetrahedron Letters 3357 (1969)) wurde eine vermutlich diastereomere Verbindung zu Alkohol 2a durch thermische Umwandlung aus Shiromodiol hergestellt.

Ein Sesquiterpen mit Lactongruppe und ähnlicher Partialstruktur wie Alkohol 2a liegt im Carabron vor, das aus verschiedenen Compositen (Carpesium-, Arnica-, Inula- und Helenium-Arten) isoliert werden konnte.



Beispiel 2

Vorschrift zur Herstellung einer auf Sesquiterpenester standardisierten pharmazeutischen Zubereitung aus *Echinacea purpurea*

I. Extraktion der Droge

Die Extraktion der Droge erfolgt durch Chloroform (bzw. andere Lösungsmittel, in denen sich die Sesquiterpenester lösen) in einer Soxhlet-Apparatur. Dadurch ist eine quantitative Extraktion der Sesquiterpenester gewährleistet.

II. Gehaltsbestimmung mittels HPLC

1. Herstellung der Analysenlösung

100,0 mg Extrakt werden in 10,0 ml Ethanol p. a. gelöst

2. HPLC-Analyse

Die quantitative Bestimmung der Sesquiterpenester erfolgt nach der Methode des Externen Standard (Eichgerade) mit Hilfe der HPLC.

Für die HPLC-Trennung wird eine Trennsäule mit einer Umkehrphase (LiChrospher RP18) verwendet. Als Fließmittel dient ein Gradient aus Acetonitril-Wassermischungen. Die Detektion kann bei 280 nm erfolgen.

Im speziellen wurden folgende Parameter verwendet:

Säule: LiChrospher RP18 5 μ ; Hibar 125—4 (Merck)

Fließmittel: A: Wasser B: Acetonitril
von 20% B linear auf 50% B in 30 Min.

1,0 ml/Min.

Detektion: 280 nm

Die Eichung erfolgte mit einer Stammlösung von Ester 1. Da sich alle gefundenen Sesquiterpenester im Molekulargewicht nur sehr unwesentlich unterscheiden und die Zimtsäure als Chromophor bei allen Estern enthalten ist, kann eine Berechnung des Gehaltes aller Ester unter Bezug auf den Korrekturfaktor von Ester 1 erfolgen.

Der Korrekturfaktor wurde in dem verwendeten System mit etwa 6×10^{-7} Flächeneinheiten/mg bestimmt.

Bei der Gehaltsbestimmung mit Hilfe der beschriebenen Methode fanden wir bei verschiedenen handelsüblichen *Echinacea purp. radix* Drogen die folgenden Mengen Sesquiterpenester:

	% Ester 1	Ester 2 a/b
E.purp.rad. GALKE 0464/81	0,13	0,19/0,17
E.purp.rad. Muggenburg 603 22	0,15	0,07/0,08
E.purp.rad. Muggenburg 603 26	0,39	0,05/0,07
E.purp.rad. Petereit 145.83	0,58	0,08/0,07
E.purp.rad. Chr. Peter 2204	0,47	0,04/0,06
E.purp.rad. H. Carroux 1747	0,54	0,02/0,06

Pharmakologie der Ester aus *Echinacea purpurea*

I. Bisher gefundene pharmakologische Daten der Sesquiterpenester aus *E. purpurea*

1. Im Granulozytentest (nach Brandt) steigerten die Ester die Phagozytoseleistung um ca. 30% (Konzentration: 0,1—0,0001 mg/ml).

2. Ester 1 und Ester 2 führen in relativ hoher Konzentration zu einer Suppression der Natural Killer Zellen.

3. Ester 1 zeigt eine signifikante Wirkung gegen Herpes-Viren.

4. Ester 1 zeigt eine positive Wirkung im Lymphozytentransformationstest.

II. Verwandte Verbindungen mit vergleichbaren Wirkungen

Untersuchungen von HALL und Mitarb. (J. Pharm. Sci 68, 537 (1979) und 69, 537 (1980)) ergaben:

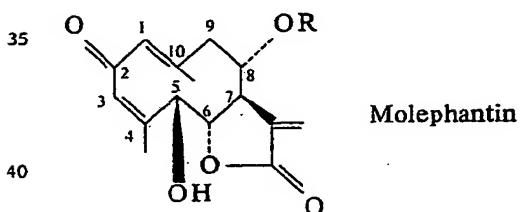
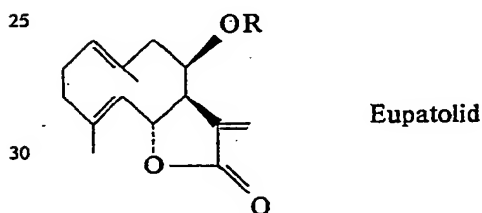
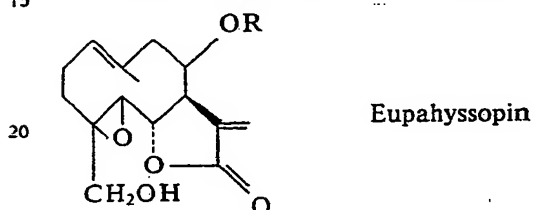
- 5 Eupahyssopin zeigt eine 57%ige Hemmwirkung im "Rattenpfotenödem-Test", eine 68%ige Hemmwirkung im "Krümm-Test" (writhing reflex), eine 66%ige Hemmwirkung im Adjuvans-Arthritis-Test, eine 36%ige Hemmung im "Antipleurisy-Screen" und eine 47%ige Hemmung der "T-zellabhängigen Hypersensitivität".

Eupatolid zeigt eine 30%ige Hemmwirkung im Rattenpfotenödem-Test und eine 36%ige Hemmung im Krümmtest.

- 10 Molephantin: 33%ige Hemmung im Rattenpfotenödemtest, 54%ige Hemmung im Krümmtest und 60%ige Hemmung im Adjuvans Arthritis-Test.

Molephantinin: 32%ige Hemmung im Rattenpfotenödemtest, 47%ige Hemmung im Krümmtest.

Alle Verbindungen weisen eine α -Methylen- γ -lacton-Gruppierung auf; die freie 6-OH-Gruppe ist für die Wirkung wichtig; das Epoxid verstärkt die Wirkung.



BEST AVAILABLE COPY

T1/5/1

1/5/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007000521

WPI Acc No: 1987-000518/198701

XRAM Acc No: C87-000199

**New sesquiterpene ester cpds. from Echinacea purpurea - with e.g.
phagocytosis promoting and antiviral activity**

Patent Assignee: LOMAPHARM LOHMAN R (LOMA-N)

Inventor: BAUER R; OTT H; WAGNER H

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3522075	A	19870102	DE 3522075	A	19850620	198701 B

Priority Applications (No Type Date): DE 3522075 A 19850620

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3522075	A		8		

Abstract (Basic): DE 3522075 A

Sesquiterpene ester cpds. of formulae (1), (2a) and (2b), obtd. by extraction of Echinacea purpurea radix or other plants of the compositae family, are new: R = aromatic acid residue, pref. cinnamoyl.

USE - The cpds. increase phagocytosis capacity by ca. 30% at 0.0001-0.1 mg/ml in the brandt granulocyte test, and suppress natural killer cells at relatively high concn. (1) also has significant activity against herpes virus, and has positive activity in the lymphocyte transformation test.

0/0

Title Terms: NEW; SESQUI; TERPENE; ESTER; COMPOUND; PURPUREA; PHAGOCYTOSIS; PROMOTE; ANTIVIRAL; ACTIVE

Derwent Class: B02; B05

International Patent Class (Additional): A61K-031/33; C07C-069/61;

C07D-303/16; C07D-493/08

File Segment: CPI

?

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)